تأثير استخدام مصادر نتروجينية مختلفة في نمو وإنتاج المضادات في بكتريا الستربتومايسس

أياد محمد علي فاضل

قسم التقانة الإحيائية ، كلية العلوم ، جامعة النهرين ، بغداد ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٨ /١١ / ٢٠٠٩ ---- **تاريخ القبول:** ٢٧ / ٤ / ٢٠١٠)

الملخص

لدراسة تأثير مصادر نتروجينية مختلفة في نمو وانتاج مضادات الحيوية في سلالات مختلفة من بكتريا الستربتومايسس استخدمت اوساط زراعية صلبة حاوية على مصادر نتروجينية مختلفة.

اظهرت النتائج ان متحلل الكازائين هو المصدر النتروجيني الافضل لانتاج مضادات الحيوية في اغلب سلالات بكتريا الستربتومايسس المختبرة، يليه الحامض الاميني لـ اسباراجين ، ثم نترات الامونيوم وبصورة افضل من المصدر النتروجيني كبريتات الامونيوم . واخيراً اظهرت النتائج عدم قدرة جميع السلالات على انتاج مضادات الحيوية في الوسط الحاوي على اليوريا كمصدر نتروجيني ، كذلك بينت النتائج عدم وجود ارتباط مباشر بين القدرة على انتاج المضاد ونمو البكتريا ستربتومايسس.

المقدمة

تنتمي بكتريا الستربتومايسس إلى مجموعة الاحياء المجهرية بدائية النواة .وهي هوائية المعيشة وموجبة لملون كرام وتنتشر بصورة رئيسية في التربة ، تمتلك مايسليا هوائية وارضية ، تتحول إلى سلاسل من الابواغ (و) .

يمتاز جنس الستربتومايسس بكونه احد اهم اجناس الاحياء المجهرية من الناحية الاقتصادية وانتاج المضادات الحيوية ، اذ تعد مصدراً لاكثر من 69 % من المضادات الحيوية المعروفة في الوقت الحاضر، بالاضافة إلى قدرة هذا الجنس على انتاج العديد من المركبات الحيوية الاخرى كالفيتامينات (3). يمتلك هذا الجنس القدرة على تحليل العديد من المواد صعبة التحلل Xenobiotics ولها دور في التحلل الحيوي للعديد من المركبات الهايدروكاربونية والمطاط والبلاستك وغيرها (4)، ويمتلك الجنس القدرة على انتاج العوامل المحفزة للنمو في مجال الزراعة وله القدرة على انتاج العديد من الانزيمات وخاصة الانزيمات لخارج خلوية والعديد من الصبغات (5 و6).

يعد الكربون احد العناصر الرئيسة الواجب توفرها في الوسط الزرعي المستخدم للنمو وانتاج المضادات الحيوية (7) ،وان بعض مصادره قد تؤدي إلى كبح الانزيمات المسؤولة عن تخليق بعض المضادات الحيوية (8 و 9) .

يعد المصدر النتروجيني من المكونات الرئيسة التي يتحتم وجودها في الوسط الزرعي المستخدم لتنمية البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية ، حيث يؤدي التغيير في تركيز أو نوع المصدر النتروجيني إلى التأثير في انتاج المضادات الحيوية ، من خلال تاثير آلية تنظيم النتروجين في عملية تخليق المضادات الحيوية (10 و11).

يتضح من ذلك أهمية دراسة تأثير نوع المصدر الكاربوني والنتروجيني ونسبه في انتاج المضادات الحيوية من سلالات البكتريا العائدة لجنس الستربتومايسس.

المواد وطرائق العمل

أ- سلالات البكتريا

استخدمت السلالات القياسية *Streptomyces aureofaciens* 3NK المنتجة للتتراسايكلين والسلالة *Saccharopolyspora erythraea* المنتجة للارثرومايسين والسلالة *Streptomyces rochei* 7434 AN4 ، اضافة إلى عزلتي الستربتومايسس المحليتان M1 و MC-53 المنتجة لمادة ضد مايكروبية ذات طيف واسع . وتمت الاشارة إلى المصادر الاصلية لهذه السلالات والعزلات وتوصيفهما بدقة في دراسات سابقة (12 و13 و 14).

ب – المواد

تم الحصول على مادة شراب منقوع الذرة وكاربونات الكالسيوم من شركةMaknur –Canda والحامض الاميني ل –اسباراجين من شركة Difco ، كما تم الحصول على نترات الامونيوم والكلوكوز وكبريتات الامونيوم ومتحلل الكازائين واليوريا من شركة BDH .

ج –الاوساط الزرعية

استخدمت مجموعة من الاوساط الاختبارية هذه الاوساط الاختبارية شملت (AN6-AN1) والتي احتوت على مصادر مختلفة من المركبات النتروجينية شملت (NH4No3 و(NH4)2SO4 و NH4C1 و L-Asparagine و(Urea,Casein hydroly sate وحسب ما مبين في (الجدول 1)

د- تحديد كثافة النمو

تم تحديد كثافة النمو لبكتريا الستربتومايسس اعتماداً على كثافة كتلة الابواغ وحجم المستعمرات مقارنة بمعاملة السيطرة ،حيث تم تحديد كثافة النمو كمياً واستنادا إلى ماورد في (12و 15) وكالاتي :

(++++): كثافة نمو ممتازة

(+++) : كثافة نمو جيدة جدا

(++) : كثافة نمو جيدة

(+) : كثافة نمو متوسطة

(±) : كثافة نمو ضعيفة

(-): عدم النمو

هـ- تحديد الفعالية التثبيطية لبكتريا الستربتومايسس

تم تحديد الفعالية التثبيطية لبكتريا الستربتومايسس بطريقة الانتشار في اقراص الآكار Agar Disc Diffusion واستنادا إلى (16) وتجاه سلالة الاختبار القياسية *Bacillus pumillus* NCTC8241 والتي تم الحصول عليها من مختبرات الرقابة الدوائية ، حيث تم استخدام المعدل لثلاثة مكررات .

نميت البكتريا على سلسلة الاوساط الاختبارية (AN6-AN1)والحاوية على مصادر نايتروجينية مختلفة مع مراعاة ان يكون سمك الوسط الزرعي متماثلاً (25 مل)في كل الاطباق ولقحت بكتريا الستربتومايسس في الاوساط الاختبارية بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة28 مْ لمدة 7 أيام ،ثم استخدام قاطع الفلين المعدني بقطر 6 ملم لعمل اقراص في الاوساط الاختبارية الملقحة ببكتريا الستربتومايسس وغير الملقحة (سيطرة) وفي ذات الوقت لقحت الاطباق الحاوية على وسط Muller-Hinton ببكتريا الاختبار *Bacillus pumillus* NCTC 8241 وذلك بنشر عدد تقريبي من الخلايا ($105x10^8$) خلية /مليليتر وباستخدام محلول ماكفرلاند ،وضعت اقراص الآكار لبكتريا الستربتومايسس على سطح الوسط ميلر هنتون الملقح ببكتريا الاختبار ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18 ساعة وتمت قراءة النتائج للاطباق ومكرراتها بقياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر باستخدام المسطرة المدرجة ثم تم استخراج المعدل لثلاثة مكررات .

النتائج والمناقشة

استخدمت مصادر نتروجينية مختلفة تمت اضافتها بنسب متساوية (12g) إلى الوسط الزرعي الاساسي كل على حدة في سلسلة الاوساط الزرعية الاختبارية (AN6-AN1) والموضحة في الجدول (1) ، حيث بينت النتائج الموضحة في الشكل (1) والذي يمثل دراسة تاثير المصادر النتروجينية المختلفة على كثافة النمو والفعالية التثبيطية للسلالة الصناعية 3NK المنتجة للتتراسايكلين حيث بينت النتائج ان هذه السلالة قد نمت بصورة ممتازة في الوسط AN2 الحاوي على كبريتات الامونيوم مصدراً نايتروجينيا، وكانت كثافة نموها جيدة جداً في الوسط AN1 الحاوي على نترات الامونيوم ،في حين كان نمو السلالة جيداً في الوسطين الحاويين على الاسباراجين ومتحلل الكازائين(AN5,AN4)على التوالي. اما في الوسطين AN3وAN6 الحاويين على كلوريد الامونيوم واليوريا على التوالي فكان نمو السلالة ذو كثافة متوسطة . أما بالنسبة لنتائج الفعالية التثبيطية فيتضح من الشكل (1)، ان اعلى فعالية تثبيطية للسلالة 3NK كانت عند استخدام السلالة النامية في الوسط الحاوي على متحلل الكازائين كمصدر نتروجيني يليه الوسط الحاوي على نترات الامونيوم (AN1) يليه الوسط (AN4) الحاوي على الاسباراجين وبفارق ضئيل للغاية ، وتمكنت السلالة من انتاج فعالية تثبيطية متوسطة في الوسطين الحاويين على كبريتات الامونيوم وكلوريد الامونيوم على التوالي في حين فقدت السلالة القدرة على انتاج المضاد في الوسط الحاوي على اليوريا .وبينت النتائج الموضحة في الشكل (2) اختلاف استجابة السلالة القياسية *SP erythraea* المنتجة للارثرومايسين للمصادر النايتروجينية المختلفة ، حيث ظهرت اعلى كثافة نمو في الوسط (AN5) الحاوي على متحلل الكازائين وكانت كثافة النمو ممتازة في هذا الوسط . واظهرت السلالة استجابة متماثلة من حيث كثافة النمو في الاوساط الزرعية الحاوية على نترات الامونيوم وكبريتات الامونيوم وكلوريد الامونيوم والاسباراجين وهي الاوساط AN2 و AN3 و AN4 على التوالي .وتبين النتائج ايضا ان المصدر اليوريا لم تكن مصدراً مناسباً على الاطلاق للسلالة *SP. erythraea* حيث لم تتمكن من النمو في الوسط الحاوي على اليوريا كمصدر نايتروجيني ، اما بالنسبة لانتاج الفعالية التثبيطية فقد اوضحت النتائج ان المصدر النايتروجيني الوحيد الملائم لانتاج فعالية تثبيطية في هذه السلالة كان متحلل الكازائين وتتفق هذه النتائج مع ما أشار اليه الباحث (Al-Aubieidi,2009) (17) في حين انعدمت القدرة على انتاج الفعالية التثبيطية في الاوساط الحاوية على المصادر النايتروجينية الاخرى.

كذلك بينت النتائج الموضحة في الشكل (3) والمتعلقة باستجابة السلالة القياسية المنتجة للمضاد الحيوي اللنكاسايدين *S.rochei* AN4 7434 والنامية في ذات المصادر النايتروجينية ، ان كثافة النمو لهذه السلالة وانتاج الفعالية التثبيطية كان مماثلاً ومتطابقاً مع استجابة السلالة *Sp.erythraea* والتي تم التطرق اليها في الشكل السابق (2) باستثناء قدرة السلالة *S.rochei* على النمو في الوسط AN6 الحاوي على اليوريا كمصدر نايتروجيني.

ويتضح من الشكل (4) ان اعلى كثافة نمو لعزلة الستروبتومايسيس المحلية M1 كانت في الوسط AN2 الحاوي على كبريتات الامونيوم مصدراً نايتروجينياً يليه الوسط AN1 الحاوي على نترات الامونيوم ثم الوسطان AN4وAN5 الحاويان على الاسباراجين ومتحلل الكازائين على التوالي، وكانت كثافة النمو متوسطة في الوسطين الحاويين على كلوريد الامونيوم واليوريا، اما اعلى انتاجية للفعالية التثبيطية فكانت وعلى التوالي في الاوساط AN5 الحاوي على متحلل الكازائين ، الوسط AN4 الحاوي على الاسباراجين،الوسط AN1 الحاوي على نترات الامونيوم ثم الوسط AN3 الحاوي على كلوريد الامونيوم واخيراً في الوسط AN2 الحاوي على كبريتات الامونيوم ، اما في الوسط AN6 الحاوي على اليوريا فلم يستطيع ان يعزز انتاج الفعالية التثبيطية.

يتضح من الشكل (5) اختلاف استجابة العزلة NC-53 بالنسبة لكثافة نموها اوانتاجها للفعالية التثبيطية في الاوساط الحاوية على مصادر نتروجينية مختلفة، حيث بينت النتائج ان افضل كثافة نمو كانت في الوسطين AN5و AN2 الحاويين على متحلل الكازائين وكبريتات الامونيوم على التوالي تليهما الاوساط AN1 و AN4 و AN6 وبكثافة نمو جيدة (6) في حين كانت افضل انتاجية للفعالية التثبيطية في الوسطين AN1 الحاوي على نترات الامونيوم والوسط AN4 الحاوي على الاسباراجين تليهما الاوساط AN2 و AN3 و AN5

في حين فقدت العزلة المحلية NC-53 القدرة على انتاج فعالية تثبيطية في الوسط AN6 الحاوي على اليوريا.

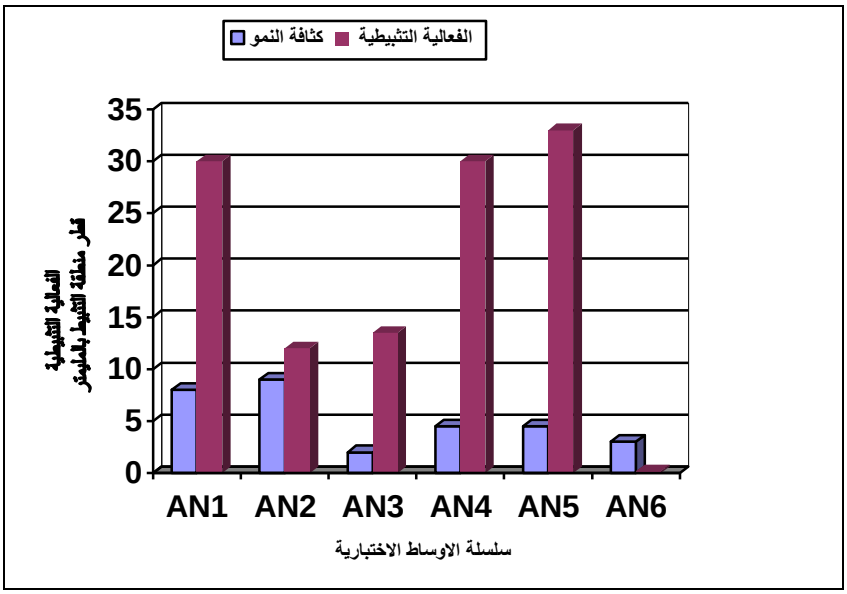
يعد المصدر النتروجيني من المكونات الرئيسية التي يستلزم وجودها في الوسط التخمري المستخدم لانتاج المضادات الحيوية ، وتؤثر أي درجة من التغيير في تركيز وطبيعة المصدر النتروجيني في انتاج هذه المضادات (18 و 19) اذ تؤدي التراكيز العالية من ايونات الامونيا إلى كبح الانزيمات الضرورية لانتاج عدد من مضادات الحيوية (20و 21 و 22) فالتراكيز العالية تعمل على كبح الانزيم المخلق للكلوتامين Glutamin Synthetase (23) وتؤدي زيادة تركيز الامونيوم في الوسط الانتاجي إلى تحفيز انزيم الالنين ديهايدروجينيز مما يؤدي إلى وفرة الحامض الاميني الالنين في الخلية وبالتالي تثبيط انتاج مضاد السيفالوسبورين المنتج من بكتريا *Streptomyces elavligerus* (24و 25) واشارات مصادرا اخرى إلى ان استخدام الامونيا كمصدر نايتروجيني ادى إلى تثبيط انتاج المضاد الحيوية الارثرومايسين (26) .

تلعب آلية تنظيم النتروجين دوراً مهماً في عملية تخليق مضادات الحيوية ، حيث يؤدي استخدام الامونيا كمصدر نايتروجيني إلى كبت الانزيمات التي تشترك في استخدام أي مصدر نايتروجيني آخر في الوسط الزرعي ومن هذه الانزيمات انزيمي Nitrite reductase والـ Arginase(27).

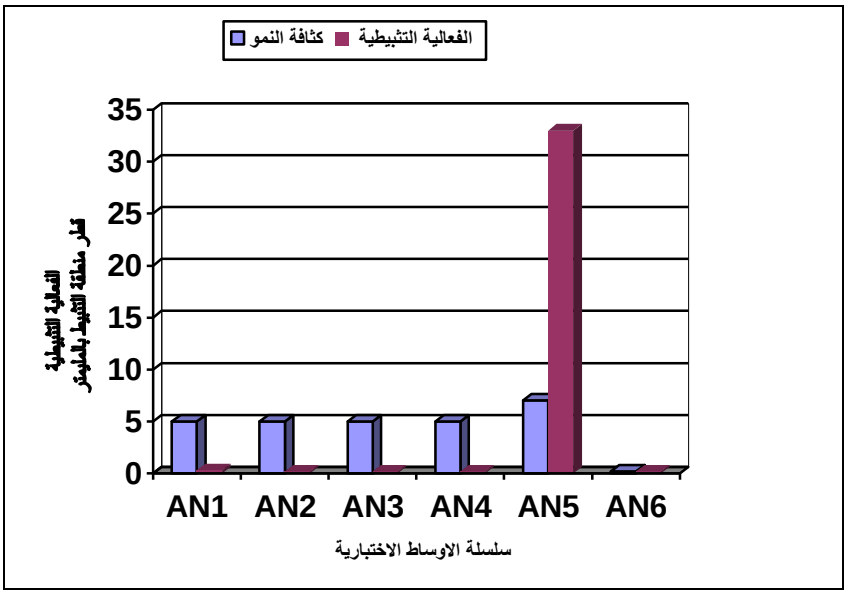
جدول (1) سلسلة الاوساط الاختبارية (AN1-AN6) تختلف مكونات هذه السلسلة في محتواها من المصدر النتروجيني

مكونات الوسط الزرعي	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6
Cornsteep liquor	5g	5g	5g	5g	5g	5g
Glueose	80g	80g	80g	80g	80g	80g
NH4NO3	12g	-	-	-	-	-
(NH4)2SO4	-	12g	-	-	-	-
NH4Cl	-	-	12g	-	-	-
L-Asparagine	-	-	-	12g	-	-
Gasein hydrolysat	-	-	-	-	12g	-
Urea	-	-	-	-	-	12g
CaCO3	4g	4g	4g	4g	4g	4g
COCl2.6H2O	0.005g	0.005g	0.005g	0.005g	0.005g	0.005g
KH2PO4	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g

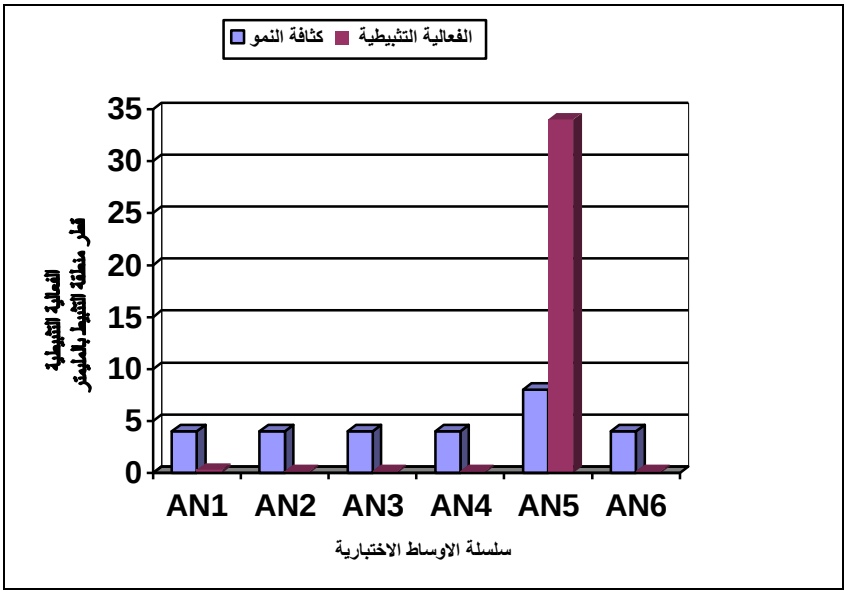
- اذيبت المكونات في لتر من الماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني إلى 7.0 ، ثم اضيف 20 غراماً من الآكار وعقم بالموصدة.



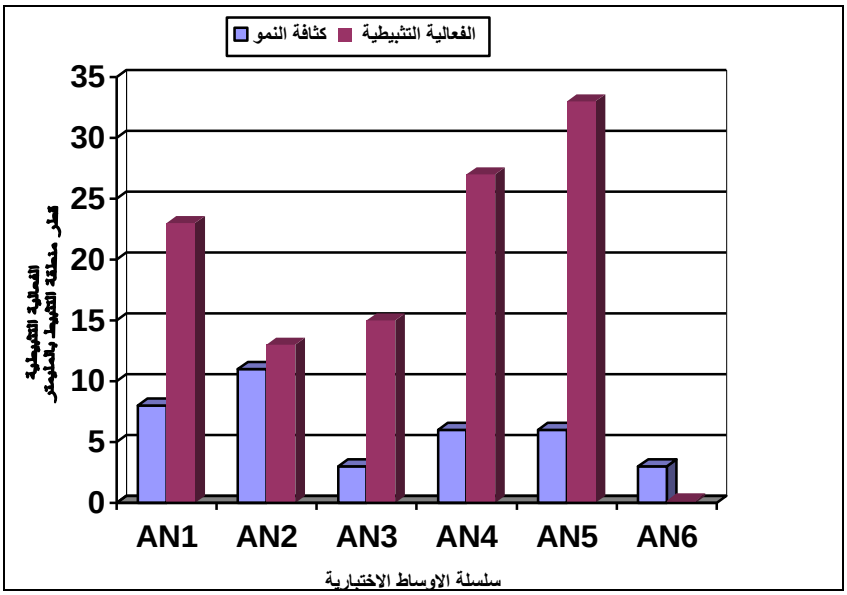
الشكل (1)(كثافة النمو والفعالية التثبيطية للسلالة الصناعية المنتجة للتراسايكلين *S.aureofaciaens* النامية في سلسلة الاوساط الاختبارية (AN1و AN6) الحاوية على مصادر نايتروجينية مختلفة) حيث تمثل بنترات الامونيوم (الوسط AN1) ، كبريتات الامونيوم (الوسط AN2) ، كلوريد الامونيوم (الوسط AN3) ، الاسباراجين (الوسط AN4) ،متحلل الكازائين(الوسط AN5) اليوريا (الوسط AN6) .



الشكل (2)(كثافة النمو والفعالية التثبيطية للسلالة الصناعية *sp.erythraea* النامية في سلسلة الاوساط الاختبارية (AN1و AN6) الحاوية على مصادر نايتروجينية مختلفة) حيث تمثل بنترات الامونيوم (الوسط AN1) ، كبريتات الامونيوم (الوسط AN2) ، كلوريد الامونيوم (الوسط AN3) ، الاسباراجين (الوسط AN4) ، متحلل الكازائين (الوسط AN5) اليوريا (الوسط AN6) .



الشكل (3)(كثافة النمو والفعالية التثبيطية للسلالة الصناعية المنتجة للنكاسايدين AN4 7434 *S.rochei* في سلسلة الاوساط الاختبارية (AN1و AN6) الحاوية على مصادر نايتروجينية مختلفة) حيث تمثل بنترات الامونيوم (الوسط AN1) ، كبريتات الامونيوم (الوسط AN2) ، كلوريد الامونيوم (الوسط AN3) ، الاسباراجين (الوسط AN4) ،متحلل الكازائين(الوسط AN5) اليوريا (الوسط AN6) .



الشكل (4)(كثافة النمو والفعالية التثبيطية لعزلة الستربتومايسس المحلية M1 النامية في سلسلة الاوساط الاختبارية (AN1و AN6) الحاوية على مصادر نايتروجينية مختلفة) حيث تمثل بنترات الامونيوم (الوسط AN1) ، كبريتات الامونيوم (الوسط AN2) ، كلوريد الامونيوم (الوسط AN3) ، الاسباراجين (الوسط AN4) ، متحلل الكازائين (الوسط AN5) اليوريا (الوسط AN6) .

المصادر

1- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P.H.A.; Staley J.T. and Williams, S.T. (1994). "Bergey's Manual of determinative bacteriology ". Ninth Edition, Williams and Wilkins , U.S.A.

2- Elliot, M.; Damji, F.; Passantino, R.; Chater, K.and leskiw, B. (1998). The bld D gene of Streptomyces colicolor A3(2): A regulatory gene involved in morphogenesis and Antibiotic production. J. Bacteriol. 180: 1549-1555.

3- Chater,K. F.and Merrick, M. J. (1979). "Streptomyces". In: Development biology of prokaryotes. PP.93-114. Parish, J.H. (ed) Blackwell Scientific publication . Oxford.

4- Lacey , J.(1988)"Actinomycetes as biodeteriogens and poliutants of the environment ".In: Actinomycetes in biotechnology. PP .359-417, Good fellow ,M.; Williams, S.T. and Mordarski, M.(eds). Academic press. London.

5- White, J. and Bibb, M. (1996). Bld Adependence of undecylproigiosin production in *Streptomyces coeliccolor* A3 (2) involves a pathway specific regulatory cascade .J. Bacteriol .PP.627-633.

6-Minamberss,B.; Olivera, E.R.; Jensen ,R.A. and Lueng, J.M. (2000).A new class of glutamate dehydrogenase .J. Biol. Chem .275 :39529-39542.

7- Chater ,K.F. and Hopwood, D.A. (1989).Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* .In : (Hopwood, D. A. and chater, K.F. eds) .PP.129-150 . Genetic of bacterical diversity . Academic Press,London.

8-Jones,G.H. (1985).Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus* .J.Bacteriol .163 : 1215-1221.

9-Demain ,A.L.and Inamin ,E.(1970) .Biochemistry and regulation of Streptomycin and monnosido Streptomycinase (a-D- mannosidase) formation .Bacteriol.Rev. 34:1-19 .

10- Gafe, U.; Bocker, H.and Thrum ,H.(1977). Regulative influence of O-amino benzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of *Streptomyces noursei* JA 38906. H. Regulation of glutamine synthetase and the role of Glutamine synthase Pathway .Z.Microbiol. 17: 201 -209.

11- Chater, K.F. and Hopwood, D.A. (1993). Streptomyces genetics. In: (Sonenshein ,A.L.; Hoch, J.A. and Losick, R.eds.).PP.83-99. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteri, Biochemistry, Physiology and Molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington :D.C.

12- Fadhil,A.M.A,(1996) .Physiological and Genetic investigation on local isolates of antibiotic producing streptomyces Ph.D Thesis,College of Science .University of Baghdad.

13- Fadhil,A.M. A. ;Ali, N.A., Al-Bakir ,A.Y. and A. Ani, F.Y.(1999).The use of some biosynthetic precursors in the directed biosynthesis of tetracycline and Erythromycin antibiotics .Biotechnology research Journal. l(0):65-73.

14- Fadhil, A.M.A ;Ali ,N.A.;AL Baker, A.Y.and AL Ani,F. Y.(2000) . The use of some Benzoate and propionate derivatives in the directed biosynthesis of tetracycline and erythromycin antibiotics. Tukrit J.Science 6: (2) :35-44.

15- Kutzner, H. J. (1981). "The family streptomycetaceae " In: The prokaryotes : A handbook on habitat ,isolation and identification of

22-Jones, G.H. (1985) .Regulation of phenoxaznone synthase expression in *Streptomyces antibioticus* .J. Bacteriol 163:1215-1221.
23- Gra'fe, V., Bocker, H.,and Thrum ,H. (1977). Regulative influence of O-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of *S.noursei* .J.A 38906. II. Regulation of glutamine synthetase and the role of glutamine synthase pathway Microbiol. 17:201-209.
24-Kasarenini ,S., and Demain, A.L. (1994). A role for alanine in the ammonium regulation of cephalosporin biosynyhesis in *S.clavuligerus* .J .Microbiol, 13 (4) : 217-219.
25-Vining, L.C., and Chatterjee,S. (1982).In overproduction of microbial products .PP.35-46 (Kramphamel, V., Siky fa, B., and vanek, Z.eds.) Academic press. London.
26- Reeve, L.M., and Baumberg, S. (1998). Physiological control of Erythromycin production by *Saccharopolyspora erythreae* are exerted at least in part of the level of Transcriptions. Biotech.20: 585-589.
27- Demain, A.L., Aharonowitz, and Martin, J.F. (1983). In: Biochemistry and Genetic regulation of commercially important antibiotic. PP. 49-72 . (Vining, L.C, edt.) Addison-Wesley, Reading , MA, U.S.A.
Bacteria " .PP.2028 – 2089 .Starr, M.P.; Stolp, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegal, H.G.(eds) . Springer-verlag ,Berlin .
16- Egorov, N.S. (1985). Antibiotic Scientific approach, Mir publishers, Moscow.
17- Al-Aubiedi, A.H.H.(2009). Study inhibition Activity for Bacteria *Bacillus Spp.* Isolate from Soil Against some pathogenic Bacteria .M.Sc. thesis. University of Baghdad.
18- Awais, M.; Shah ,A.A. ;Hameed.A.; and Hasan , F.(2007). Isolation, Identification and Optimization of Bacitracin produced by *Bacillus sp.* Pak. J.Bot. 39 (4): 1303-1312.
19- Pinchuk, I. V. ;Bressollier, P. ; Sorokulova, I. B. ; rerneuil, B. and vradic, M.C., (2002). Amicoumacin antibiotic production and genetic Diversity of *Bacillus subtiliss* strain isolated from different habitats Res.microbiol.153: 269-276.
20- Al-Delami, K,S.D.(2002). Microbial Enzymes and Biotechnology. Pheladdiphic University. Jordan.
21- Gallo, M. and Katz, E. (1972).Regulation of secondary metabolite biosynthesis, catabolite repression of phenoxazionone synthesis and actinomycin formation by glucose .J. Bacteriol.109: 659-667.

The Effect of different Nitrogen Sources in the growth and antibiotic production in *Streptomyces*

Fadhil, Ayad M.Ali
Biotechnology Dept, Science college , Al-Nahrain University ,
(**Received:** 8 / 11 / 2009 ---- **Accepted:** 27 / 4 / 2010)

Abstract
A solid culture media containing different Nitrogen sources were used for to study their effects on the growth and antibiotic production of selected strains of *Streptomyces spp*.
Results indicates that the casein hydrolysate was the best nitrogen source for antibiotic production in most of the tested *Streptomyces* strains, the second best nitrogen source was the amino acid L-Asparagine ; then NF4No3 , the latter better than the Ammonium sulfate.
Results also indicated that None of the tested *Streptomyces* strains were capable to produce antibiotics in the medium containing urea as the sole nitrogen source.